UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1969 • Thèse n° 171

Le phénomène de transformation du Lymphocyte cultivé en présence de Phytohémagglutinine Technique d'étude personnelle Aspects morphologiques

Thèse pour le Doctorat en Médecine

présentée et soutenue publiquement

le Mercredi 9 Juillet 1969

par André RENAUT

Élève de l'École Principale du Service de Santé de la Marine
Diplômé de Médecine Tropicale

né le 3 Mars 1942 à MARSEILLE (Bouches-du-Rhône)

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

MM G. MORETTI, Professeur . . . . . Président

H. LÉGER, Professeur . . . . . } Juges

R. CANIVENC, Professeur . . . . . } Juges

J. STAEFFEN, Professeur . . . . . } Juges

Éditions Bergeret, 2, rue Bergeret - BORDEAUX
— Tél: 91-12-59 —

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYENS HONORAIRES : MM. G. PORTMANN, R. SIGALAS, F. TAYEAU.
DOYEN : M. H. BRICAUD. — **ASSESSEURS** : MM. J. MASQUELIER, N...

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. CHARRIER, DUBREUIL, CREYX, DARGET, R. SIGALAS, G. PORTMANN, M. RIVIÈRE, R. GIRARD, C. PIFFAULT, R. FABRE, R. DUFOUR, P. FOURMENT, E. AUBERTIN, X. J. DUBECQ, L. MASSÉ, A. LACHAPÈLE, G. VITTE, J. DESPONS, G. DUBOURG.

MAITRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ HONORAIRE : M. BERGER.

PROFESSEURS TITULAIRES

MM.	
P. DELMAS-MARSALET	Clinique des maladies nerveuses et mentales.
P. DERVILLÉE	Médecine légale et Médecine du travail.
R. MANDOUL	Zoologie et parasitologie.
R. CASTAGNOU	Toxicologie et hygiène appliquée.
J. REBOUL	Carcinologie.
P. MESNARD	Chimie organique et Chimie analytique.
R. GRANDPIERRE	Physiologie.
P. BROUSTET	Clinique médicale cardiologique.
N	Clinique chirurgicale.
F. TAYEAU	Biochimie médicale A.
G. MAYER	Histologie et embryologie.
P. BLANQUET	Physique nucléaire appliquée et radiobiologie.
R. SARIC	Clinique médicale.
L. POUYANNE	Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique.
J.-J. DUBARRY	Hydro-climatologie thérapeutique et clinique des maladies de l'appareil digestif.
F.-J. TRAISSAC	Clinique thérapeutique.
R. MAHON	Clinique d'accouchements.
R. PAUTRIZEL	Immunologie et biologie parasitaire.
Mlle G. ROUGIER	Biologie appliquée à l'éducation physique et aux sports.
G. MOUSTARDIER	Bactériologie.
E. BESSIÈRE	Clinique ophtalmologique.
H. LEGER	Anatomie pathologique.
J. MASQUELIER	Matière médicale.
G. MORETTI	Clinique médicale propédeutique et médecine tropicale.
N	Clinique oto-rhino-laryngologique.
P. LAUMONIER	Clinique chirurgicale pleuro-pulmonaire.
J. LENG-LÉVY	Clinique médicale et des maladies infectieuses.
R. LETAC	Pathologie et recherche chirurgicales.
R. QUILICHINI	Pharmacie galénique.
E. NEUZIL	Biochimie médicale B.
R. STOLL	Biologie.
J. LANGE	Clinique urologique.
P. FRÉOUR	Hygiène et Clinique de pneumophtisiologie.
F. RIGAUD	Anatomie.
J. FAURE	Médecine expérimentale et physiopathologie.
N	Clinique chirurgicale des maladies cardiaques.
J. VILLAR	Clinique gynécologique.
P. LE COULANT	Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.
M. BERGOUIGNAN	Pathologie nerveuse et mentale.
J. DUHAMEL	Physique médicale et pharmaceutique.
R. BABIN	Pharmacie chimique.
H. CHOUSSAT	Pathologie médicale.
L. CHASTRUSSE	Clinique obstétricale.
P. VERGER	Clinique médicale des maladies des enfants.
F. LAPORTE	Chirurgie générale.
R. TINGAUD	Clinique chirurgicale.
H. LAUBIE	Botanique et cryptogamie.
Cl. RICHIR	Anatomie pathologique.
R. GOLSE	Chimie générale et Chimie minérale.
J. BAILENGER	Zoologie et biologie animale.
J.-Cl. COLLETER	Chimie analytique.
H. BRICAUD	Médecine générale.
P. BENOIT	Clinique odonto-stomatologique.
Cl. MARTIN-DUPONT	Clinique néphrologique
J. CANELLAS	Pharmacodynamie et hydrologie.
R. CANIVENC	Histologie.
G. DELORME	Electroradiologie.
J. DEPAULIS	Séméiologie chirurgicale.
J. RIVIÈRE	Séméiologie médicale.
H. DULONG DE ROSNAY	Bactériologie.
R. CROCKETT	Chimie organique et chimie analytique.
R. DARMAILLACQ	Chirurgie générale.
H. POUYANNE	Clinique neuro-chirurgicale.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM.	
J. DAVID-CHAUSSÉ	Médecine générale.
J. MARQUEVIELLE	Biochimie médicale.
M. BLANC	Neuro-psychiatrie.
Cl. MASSÉ	Chirurgie générale.
R. MARAUD	Histologie et embryologie.
P. DU PASQUIER	Bactériologie.
J. STAEFFEN	Médecine générale.
J.-P. DUBECQ	Obstétrique.
G. NEVERRE	Physiologie.
J. MEUNIER	Histologie.
A. SERISÉ	Hygiène.
P. FERRET-BOUIN	Physique médicale.
J. VIDEAU	Anatomie.
R. CASTAING	Médecine générale et thérapeutique.
P. BLANCHOT	Médecine générale.
L. DOUTRE	Chirurgie générale.
P. LOISEAU	Neuro-psychiatrie.
Cl. VRIGNAUD	Physique pharmaceutique.
P. SOURREIL	Dermato-vénéréologie.

MAITRES DE CONFERENCES AGRÉGÉS :

MM.	
R. JENSEN	Chimie biologique.
J. BROUSSIN	Electroradiologie.
R. TESSIER	Pneumo-phtisiologie.
Mme J. SÉCHET	Biochimie médicale.
C. LAGARDE	Carcinologie.
C. BÉRAUD	Thérapeutique.
H. LAZARINI	Médecine légale et Médecine du travail.
J. SOUMIREU-MOURAT	Obstétrique.
G. CABANIEU	Médecine générale.
R. LE LOURD	Pneumo-phtisiologie.
L. COURAUD	Chirurgie générale.
J. BENTÉGEAT	Hématologie.
L. ARNÉ	Médecine générale et thérapeutique.
Cl. MARTIN	Pédiatrie.
R. BAUTE	Cryptogamie.
V. DARGELOS	Microbiologie.
Mlle S. LARCEBAU	Toxicologie.
C. WONÉ	Médecine générale et thérapeutique.
J. JULIEN	Médecine générale et thérapeutique.
J.-J. BATTIN	Pédiatrie.
M. DALLOCCHIO	Cardiologie et maladies vasculaires.
J. AUBERTIN	Maladies infectieuses.
P. VÉRIN	Ophtalmologie.
M. GOT	Neuro-chirurgie.
J. TAVERNIER	Electroradiologie : diagnostic et thérapeutique.
J. VINCENT	Physiologie et explorations fonctionnelles.
L. CHEVAIS	Anesthésiologie.
G. GILLARDEAU	Anesthésiologie.
J. HONTON	Orthopédie et traumatologie.
M. BOMBART	Orthopédie et traumatologie.
A. HUGUES	Cancérologie.
M. SABATHIÉ	Anesthésiologie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

MM.	
M. PORTMANN	Oto-rhino-laryngologie.
F. BALLANGER	Urologie.
P. BIRBIS	Chirurgie générale.
J.-P. CALAMEL	Chirurgie générale.
L. TEXIER	Dermato-syphiligraphie.
R. GENESTE	Orthopédie.
F. FONTAN	Chirurgie générale.
J. LASSERRE	Orthopédie.

AGRÉGÉS LIBRES

MM.	
G. FAUGÈRE	Obstétrique.
M. L'ÉPÉE	Médecine légale.
H. CABANIÉ	Anatomie.
L. CORCELLE	Ophtalmologie.

CHARGÉS DES FONCTIONS DE MAITRE DE CONFÉRENCES :

MM.	
P. BONJEAN	Anatomie.
M. LAHOURCADE	Parasitologie.
M. SENTENAC	Anatomie.
G. DELMON	Anatomie pathologique.
J. TRIBOULEY	Immunologie, sérologie.
F.-X. MICHELET	Stomatologie.
E. JOUZIER	Chimie biologique (Pharmacie).
L. PINSON	Oto-rhino-laryngologie.
F. COHADON	Neuro-chirurgie.
J.-Cl. ROQUES	Physique médicale.
P. ESCHAPASSE	Physique médicale.
J. PACCALIN	Médecine générale et thérapeutique.

Le Conseiller administratif, Chef des services administratifs
André ARGILAS.

L'Attaché d'administration universitaire, Directeur du cabinet :
Madame M. C. CHAPENOIRE.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation, ni improbation.

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1969 - Thèse n° 171

Le phénomène de transformation du Lymphocyte cultivé en présence de Phytohémagglutinine Technique d'étude personnelle Aspects morphologiques

Thèse pour le Doctorat en Médecine

présentée et soutenue publiquement

le Mercredi 9 Juillet 1969

par André RENAUT

Élève de l'École Principale du Service de Santé de la Marine
Diplômé de Médecine Tropicale

né le 3 Mars 1942 à MARSEILLE (Bouches-du-Rhône)

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

MM G. MORETTI, Professeur . . . . . Président

H. LÉGER, Professeur . . . . . Juges

R. CANIVENC, Professeur . . . . . Juges

J. STAEFFEN, Professeur . . . . . Juges

Éditions Bergeret, 2, rue Bergeret - BORDEAUX
— Tél : 91-12-59 —

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A LA MEMOIRE DE MON PERE

A MA MERE

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543911_0001

A MA FEMME

A DOMINIQUE, PASCALE et ANNE-MARIE

AUX MIENS et A TOUS CEUX
qui, tout au long de mes études,
m'ont soutenu de leur amitié.

A LA MEMOIRE DU DOCTEUR G. SCHNEIDER

A MES CAMARADES DE L'ECOLE DE SANTE NAVALE

AU PERSONNEL DU LABORATOIRE DE MEDECINE TROPICALE

AUX PROFESSEURS ET AUX OFFICIERS

de l'Ecole Principale

du Service de Santé de la Marine

A NOS MAÎTRES

de la Faculté de Médecine et des Hôpitaux

de Bordeaux

A Monsieur le Docteur VEYRET

Médecin en Chef de 2ème Classe du Service de Santé de la Marine
Diplômé de Sérologie et Bactériologie de l'Institut Pasteur
Diplômé d'Anatomie pathologique de la Faculté de Paris
Chevalier de la Légion d'Honneur
Croix de Guerre 1939-1945
Croix de Guerre T.O.E.
Chevalier de l'Ordre du Viet-Nam

Vous nous avez proposé le sujet de ce travail et dans sa réalisation vous nous avez constamment guidé et conseillé avec une grande bienveillance.

Veuillez trouver ici l'expression de nos respectueux remerciements.

A Monsieur le Médecin Général de 2ème Classe N U N

Directeur de l'Ecole Principale
du Service de Santé de la Marine
Spécialiste des Hôpitaux des Armées
Chevalier de la Légion d'Honneur
Officier de l'Ordre National du Mérite
Croix de Guerre 1939-1945

A Monsieur le Médecin en Chef de 1ère Classe LESTAGE

Sous-Directeur de l'Ecole Principale
du Service de Santé de la Marine
Chevalier de la Légion d'Honneur

A Monsieur le Professeur R. GENESTE

Agrégé d'Orthopédie
Chirurgien assistant des Hôpitaux

Vous nous avez accueilli avec la plus grande bienveillance. Bénéficiant de vos leçons et de vos conseils, à vos côtés, nous avons appris à ne point faire de distinction entre le travail théorique et les réalités quotidiennes.

Veuillez trouver ici le témoignage de notre reconnaissance et de notre grande admiration.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur J. STAEFFEN

Professeur sans Chaire (Médecine générale)
Médecin des Hôpitaux
Chevalier des Palmes académiques

Monsieur le Professeur R. CANIVENC

Professeur d'Histologie et d'Embriologie
Biologiste des Hôpitaux
Officier des Palmes académiques

Monsieur le Professeur H. LEGER

Professeur d'Anatomie pathologique
Médecin des Hôpitaux, Chef de Service
Officier des Palmes académiques

Hommage respectueux.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur G. MORETTI

Professeur de Clinique médicale propédeutique
et Médecine tropicale
Médecin des Hôpitaux, Chef de Service
Médecin des Hôpitaux Maritimes
Officier de la Légion d'Honneur
Croix de Guerre 1939-1945
Officier des Palmes académiques
Chevalier du Mérite maritime
Chevalier de l'Etoile d'Anjouan
Mérite de l'Afrique Noire

Vous nous avez accueilli dans votre laboratoire, éveillant ainsi notre vocation à servir outre-mer. Puissions-nous être digne de votre enseignement.

Veuillez nous faire l'honneur de trouver ici l'assurance de notre reconnaissance et de notre profond respect.

LE PHENOMENE DE TRANSFORMATION DU LYMPHOCYTE CULTIVE EN PRESENCE DE PHYTOHEMAGGLUTININE

Technique d'étude personnelle .
Aspects morphologiques .

Dès 1905 T. B. OSBORNE, L. B. MENDEL, et I. F. HARRIS (37) mettent en évidence la présence d'une hémagglutinine dans les graines de plusieurs légumineuses tels que les haricots, les lentilles, les pois, les fèves. Ce n'est que plusieurs dizaines d'années plus tard que de nombreux travaux en particulier ceux de J. BOURDILLON en 1949 (5-6) , ceux de M. COULET, R. CLUZEL, M. J. BEZOU en 1956 (12) permettent la mise au point de procédés d'extraction d'un extrait de graines de haricot (Phaseolus vulgaris) qui est alors utilisé en laboratoire pour agglutiner les hématies, ce qui permet de les séparer des leucocytes et de faciliter l'étude de ces derniers .

En 1960 NOWELL (36) aux Etats-Unis, utilisant cette méthode de séparation des leucocytes en culture pour l'analyse chromosomique, découvre que l'adjonction de phytohémagglutinine (x) aux milieux de culture classiques des lymphocytes entraîne une prolifération et une transformation remarquables de ceux-ci .

Ces dernières années de nombreux travaux sont publiés concernant la transformation des lymphocytes obtenue par différents procédés, soit de manière non spécifique, à l'aide d'extraits d'autres légumineuses (26) ou d'antistreptolysine S (10) ; soit de façon spécifique par la tuberculine, le TAB , l'anatoxine diphtérique,la vaccine,

(x) *phytohémagglutinine = PHA.*

les antigènes du bacille hemophilus, l'antistreptolysine O, qui sont capables d'induire la transformation des petits lymphocytes de sujets sensibilisés à ces différents antigènes (10) .

L'ensemble de ces travaux (1-2-15-16-19-29-32-42)a entraîné une révision de la conception classique du rôle du petit lymphocyte, considéré jusqu'alors comme une cellule terme de lignée, incapable de se diviser et à durée de vie courte . DUBREUIL avait déjà signalé leurs "potentialités évolutives variées" et les considérait comme des "éléments jeunes (17) . Cette pluripotentialité et son rôle immunologique ne font aujourd'hui aucun doute . (4-8-14-27-40-43-44) .

Différentes techniques ont été proposées pour cultiver les petits lymphocytes du sang circulant et étudier le phénomène de transformation à différents points de vue (1-2-7-10-11-13-21-24-39), en particulier pour l'étude de différents facteurs susceptibles d'induire, d'inhiber , de modifier ce phénomène ou de l'adapter au diagnostic de différentes allergies (23-31-38-) .

Nous avons cherché à mettre au point une technique moins complexe et plus rapide nous permettant d'étudier d'une part les différents aspects morphologiques en microscopie optique des cellules transformées, et d'autre part les modifications éventuelles du phénomène de transformation au cours de variations physico-chimiques des conditions de culture .

TECHNIQUE DE CULTURE

DESCRIPTION

1°- Matériel nécessaire .

Tube Jouan de 30ml stérile contenant : 5 ml de milieu "199 modifié", dit milieu de Parker (30-34) 500 unités d'héparine .

Au moment de son utilisation ce milieu doit être de préparation récente (moins de cinq jours) et contenir les antibiotiques suivants :

- Pénicilline 100.000 U pour 500 ml
- Streptomycine 0,05g pour 500 ml .

Nous utilisons des tubes à pipette Pasteur de 5 mm de diamètre, d'une trentaine de cm de longueur que nous siliconons de la manière suivante :

- Laver au sulfochrome 24 h.
- Rincer à l'eau ordinaire, puis distillée, puis bidistillée .
- Immerger 10 s. dans une solution de Siliclad à 1%
- Rincer abondamment en eau ordinaire, distillée puis bidistillée .
- Sécher pendant 10 mn à 212° .
- Obturer les extrémités au coton cardé .
- Stériliser au Poupinel 45 mn à 180° .

A la flamme d'un bec bunsen, nous pratiquons deux effilures, en ménageant une partie ampullaire de 12 cm de longueur (cf. photo).

2°- Prélèvement

Après une soigneuse désinfection de la peau , à l'éther, on prélève à la seringue 5ml de sang qui sont immédiatement transférés dans le tube Jouan contenant le milieu de culture hépariné . Ce transfert sera effectué le plus stérilement possible . On gardera quelques gouttes de sang pour faire un frottis de contrôle .

3°- Adjonction de la PHA - Répartition en pipettes .

Le sang étant prélevé directement sur le milieu de culture hépariné il est possible de différer de quelques heures le transport du tube au laboratoire à condition de le maintenir à une température au moins égale à 20° .

On rajoute alors la phytohémagglutinine à raison d'une goutte (1/20 ml) par tube . On utilise la Bacto Phytohémagglutinine "P" (Difco) .

Cette PHA "P" a l'avantage d'être stérile et d'être cinquante fois plus active que la PHA "M", tant en ce qui concerne son pouvoir agglutinant que sa capacité mitoginétique .

Le tube est agité quelques instants puis on procède à la répartition en pipettes, préparées comme indiqué ci-dessus .

Cette répartition se fait dans les meilleures conditions de stérilité selon la technique bactériologique classique . (Près de la flamme d'un bec Bunsen ; flamber les extrémités effilées, les briser dans la flamme , aspirer à l'aide d'un tube de Guillemot , flamber, boutonner). L'extrémité ayant servi à aspirer est effilée et boutonnée à son tour, puis on coude l'extrémité supérieure (cf. photo).

On obtient ainsi le mélange sang, milieu de culture à parties égales dans des sortes d'ampoules scellées, stériles, emplies aux deux tiers que l'on met à incuber en position verticale , à 37° .

4°- Récupération de la couche leucocytaire -confection des frottis .

Très rapidement le contenu des pipettes présente trois couches distinctes :

Au fond les hématies agglutinées par la PHA, puis une couche leucocytaire d'un à deux millimètres, enfin un surnageant clair .

Au bout du temps d'incubation choisi, on va récupérer la couche des leucocytes en la poussant dans l'effilure supérieure de la pipette à l'aide de l'appareil suivant (cf. photo) :

Une colonne de verre de 10 mm de diamètre et 30 cm de haut, contenant du mercure est reliée par une double tubulure souple à deux seringues : l'une de 20 ml , l'autre de 1 ml . La tubulure reliant la colonne à la grosse seringue comporte une molette de bloquage .

Les deux seringues, fixées à une potence , sont placées verticalement à côté de la colonne à une hauteur convenable afin d'équilibrer la pression de celle-ci selon le principe des vases communicants (cf. photo) .

Nous procédons comme suit, chaque détail ayant son importance pour la réussite finale des frottis .

Briser l'effilure supérieure coudée, afin de rétablir la pression atmosphérique normale dans la pipette . Reboutonner à la flamme . Briser l'effilure inférieure. Placer la pipette dans la colonne, son extrémité inférieure plongeant dans 1 cm de mercure .

La pipette est maintenue par un bouchon souple de caoutchouc, son effilure coudée est alors brisée .

A l'aide de la grosse seringue on pousse doucement le mercure, le contenu de la pipette est alors chassé à l'extérieur par l'effilure coudée, d'abord le surnageant, puis dès que la couche leucocytaire atteint la partie rétrécie, on bloque le mercure par la molette placée sur la tubulure de la grosse seringue et on finit de pousser à l'aide de la petite, ceci afin de ne pas dissocier

la couche leucocytaire . Cette dernière est recueillie goutte à goutte sur des lames au préalablement bien dégraissées et séchées .

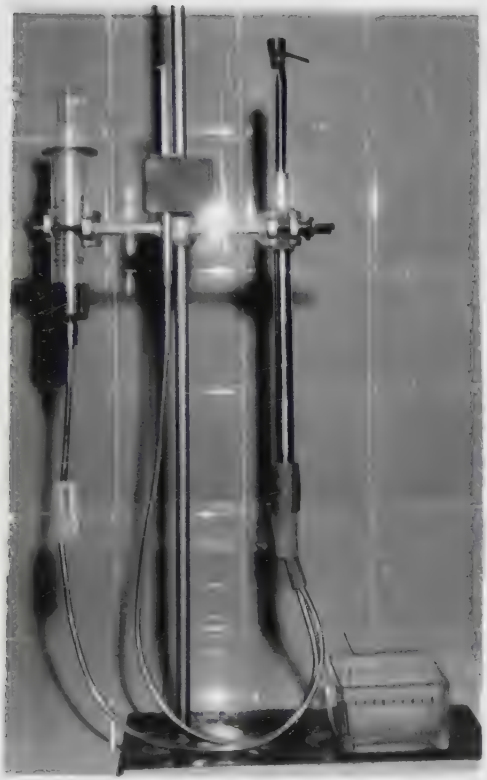
On étale en frottis mince selon la technique classique en hématologie, avec une lamelle rodée en prenant bien garde que tous les bords du frottis soient suffisamment éloignés des bords de la lame afin d'en permettre une bonne lecture au microscope .

On les colore par la méthode de May Grunwald-Giemsa classique .

1 - *Récupération de la couche leucocytaire.*

2 - *Différents types de pipettes.*

3 - *Différents stades de la préparation des pipettes.*



DISCUSSION

INCONVENIENTS

- Partant de sang total, la présence de polynucléaires et de monocytes n'est-elle pas gênante ? Non car ces éléments s'altèrent très rapidement, les monocytes les premiers, puis les polynucléaires neutrophiles, les éosinophiles paraissent résister plus longtemps . Au bout de 72 h. de culture, ces éléments sont pratiquement tous lysés . Dans un seul cas, nous n'avons pas obtenu de transformation chez un sujet dont la formule montrait 95% de polynucléaires neutrophiles . Comme le signalent les auteurs (10) le fait de conserver les hématies ne présente aucun inconvénient .

- D'une autre importance est le rapport entre le nombre de lymphocytes, le volume de plasma et de milieu . Pour un hématocrite normal et dans les conditions de culture indiquées le rapport plasma milieu est de l'ordre de 1/2 ce qui correspond sensiblement au rapport optima signalé par les auteurs (10-23) .

Le nombre de lymphocytes par ml de culture peut toujours être calculé indirectement si on fait l'hémogramme du sujet au moment du prélèvement . Certains auteurs pensent qu'il faut réaliser une concentration optima en lymphocytes pour obtenir une transformation satisfaisante (7-10-38) .

En pratique nous obtenons de bons résultats pour des sujets ayant par mm^3 de sang un nombre de leucocytes allant de la normale à 20.000, sans faire aucune correction pour rechercher ce taux optima qui serait de l'ordre de 2×10^6 cellules par ml de culture (10-23-38).

Nous devons toutefois signaler que nous n'avons pas l'expérience des cytopénies et que, dans ce cas, des proportions différentes pourraient être préconisées.

AVANTAGES :

Concernant le prélèvement :

La quantité de sang prélevée est minime par rapport à celle nécessaire pour d'autres techniques de culture. Le prélèvement effectué directement sur le milieu hépariné, évite le transport du sang sur tube hépariné avant la mise en culture ; ce transport intermédiaire, nous l'avons vérifié, est source de fragilisation cellulaire et de souillure possible, certains germes inhibant la pousse cellulaire. A ce sujet, nous avons pu vérifier que ce n'était pas tant la présence de germes, que leur qualité, qui a une influence, en effet, si certains inhibent le phénomène de transformation, d'autres ne semblent pas le perturber.

Intérêt de la répartition en pipettes.

Ce procédé évite les centrifugations, les remises en suspension dans du plasma, ou du milieu de culture.

La seule adjonction de PHA assure l'agglutination des hématies, et ainsi la séparation des leucocytes, et la transformation des lymphocytes (25). Il est toujours possible de préparer une pipette avant l'adjonction de PHA afin d'avoir une culture témoin sans PHA.

La récupération des leucocytes ne nécessite qu'un appareillage simple, peu onéreux et l'exploitation d'une pipette ne demande que quelques minutes.

Enfin le principal intérêt de cette technique réside dans le fait que nous avons essayé de réduire au minimum les paramètres ayant une influence sur la culture. Seul subsiste le volume d'air restant dans la pipette . Nous fixons arbitrairement le remplissage des pipettes aux 2/3.

Ainsi, à partir d'un même prélèvement, il sera possible d'obtenir plusieurs pipettes, toutes identiques . On peut alors, dans chacune d'elles faire varier un seul facteur susceptible d'avoir une influence sur le phénomène de transformation et l'étudier séparément par rapport à des pipettes témoins .

par exemple :

- température de culture différente .
- adjonction de différents extraits .
- variations du volume de la poche à air , etc...

De plus, l'exploitation des pipettes d'une même série à des temps différents permet de se faire une idée de la cinétique du phénomène .

Enfin la récupération de la couche leucocytaire peut se faire dans de bonnes conditions de stérilité, permettant son transfert dans du milieu neuf, et en présence de différents facteurs ou extraits ; nous y reviendrons dans le chapitre suivant .

ASPECTS MORPHOLOGIQUES

ICONOGRAPHIE

Ces photographies ont été prises au photo - microscope Zeiss.

objectif 100 - 1,250 el.

optovar 1,6.

Film Kodacolor X - développement C_{22} .

La photographie 1 de la planche I donne l'échelle , toutes les autres photographies ayant le même rapport d'agrandissement .

xxxxx

PLANCHE I

1 - *Petit lymphocyte.*

2 - *Cellule transformée de type blastique.*

3 - *Cellule transformée de type blastique avec vacuoles en couronne autour du noyau.*

4 - *Autre cellule transformée de type blastique.*

5 - *Cellule blastique à cytoplasme plus abondant et plus clair.*

6-7-8-Différents aspects de cellules plasmocytoïdes.

9 - *Cellule de type réticulaire.*

10 - *Cellule blastique et cellule à orientation réticulaire.*

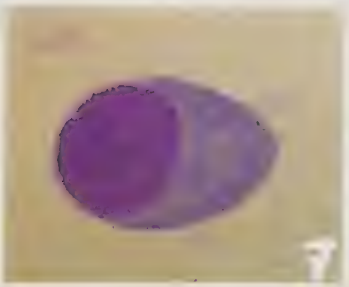


PLANCHE II

1 - *Cellule blastique en mitose.*

2 - *Cellule avec volumineux nucléole. Aspect dégénératif ?*

3 et 4 - *Cellules à cytoplasme granuleux.*

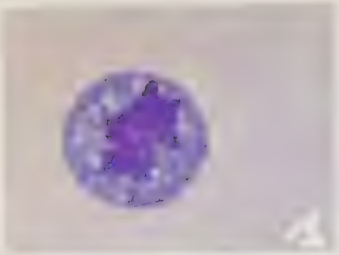
5 - *Noyau avec volumineuses mottes chromatiniennes.*

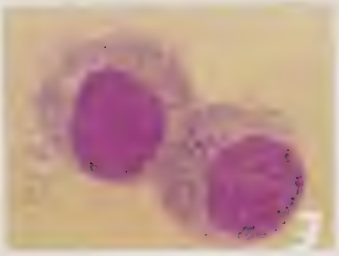
6 et 7 - *Aspects de cellules binucléées.*

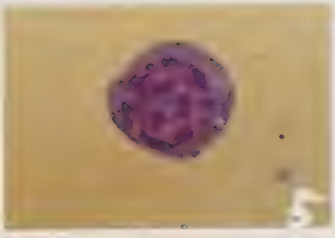
8 - *Cellule "têtard".*

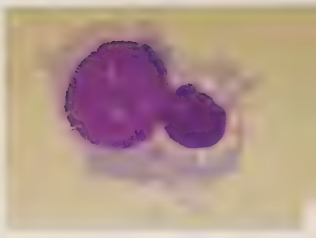
9 - *Cellule avec volumineuse vacuole.*

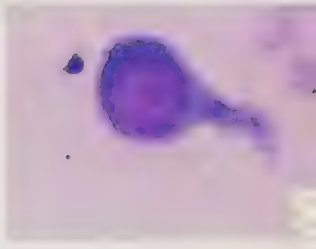
10 - *Placard de cellules de type réticulaire, avec granulations cytoplasmiques.*











Les différents aspects des cellules transformées que nous décrivons chez le sujet normal sont analogues à ceux que nous avons observés dans les quelques cas pathologiques que nous avons eu l'occasion d'étudier.

EN L'ABSENCE DE PHA

Nous n'observons pas de cellules transformées typiques, nous notons parfois quelques aspects intermédiaires. Certains auteurs signalent une transformation de l'ordre de 2% (38) parfois plus (22).

xxxxx

EN PRESENCE DE PHA

Après 72h de culture .

Les polynucléaires et monocytes sont lysés .

Quelques petits lymphocytes sont encore viables.

On note l'apparition en grand nombre de cellules volumineuses d'environ 20 à 30 µ de diamètre, leur cytoplasme est très basophile , souvent séparé du noyau par une zone plus claire, parsemé de vacuoles à l'emporte-pièce . Le noyau est gros, arrondi, il possède un à deux nucléoles proéminents, la chromatine est dense (planche I, 2-4) .

Les cellules sont, soit isolées, soit le plus souvent groupées en amas de huit à dix, parfois plus . On les trouve en bordure et en queue de frottis . C'est là l'aspect classique, décrit par les auteurs (10-24-36), du lymphocyte transformé, prenant le type de cellule blastique .

Il n'est pas rare cependant d'observer quelques aspects différents, peu décrits :

- cellules d'allure plasmocytoïde (I - 6-7-8).
- cellule à cytoplasme moins basophile avec rapport nucléoplasmatique plus bas (I - 5) .

Après le quatrième jour de culture.

C'est à ce stade que la transformation paraît la plus importante . 70 à 80% des cellules observées sont du type blastique, que nous venons de décrire,évoquant un haut potentiel mitotique .

Ces cellules, comme les lymphocytes, présentent une réaction négative aux peroxydases (coloration de Sato) .

Les vacuoles cytoplasmiques sont P. A. S. (x) négatives , et ne se colorent pas au Noir Soudan, tant par la technique de Sheenan et Storey que par celle de Rheingold (3) .

Après le cinquième jour de culture.

On observe encore la persistance de cellules blastiques typiques , mais la majorité d'entre elles prennent un aspect beaucoup plus vacuolaire, parfois en couronne autour du noyau (I - 3) .

A ce stade, on peut rencontrer, mais beaucoup plus rarement, quelques cellules présentant des vacuoles nucléaires à l'emporte-pièce . L'examen de nombreux frottis nous permet de penser que la présence de ces vacuoles nucléaires serait un signe de dégénérescence, contrairement aux vacuoles cytoplasmiques, que nous avons pu observer dans des cellules en mitose (II - 1) .

On note également quelques rares cellules d'aspect réticulaire, à contours irréguliersdont le cytoplasme présente une coloration gris-bleuté, à limite estompée . Le noyau polymorphe comporte un à deux nucléoles bleutés et une chromatine finement ouvragée en réseau régulier (I - 9) .

Parfois on remarque la juxtaposition de cellules blastiques typiques et de cellules présentant un début d'orientation de type réticulaire : noyau encore arrondi , mais réseau chromatinien plus fin, cytoplasme déjà gris bleuté, absence de vacuoles cytoplasmiques (I - 10) .

(x) *Periodic Acid Schiff (Coloration de Mac Manus).*

Au-delà du dixième jour de culture.

La quasi totalité des cellules présente un aspect dégénératif avancé.

Au cours de l'examen de nombreux frottis , nous avons eu l'occasion de rencontrer quelques rares cellules atypiques de signification et d'interprétation difficile. Nous avons cru bon d'en donner quelques exemples dans notre iconographie (planche II - 2 à 10) (44) .

xxxxx

Appréciation du phénomène

Nous insistons sur la diversité des aspects de ces cellules . Au quatrième jour de culture il existe en outre des stades intermédiaires entre le petit lymphocyte et la cellule blastique , ce qui explique la difficulté d'apprécier de façon précise l'importance du phénomène de transformation .

Pour notre travail nous préférons adopter une notation large, plutôt que des pourcentages précis qui risqueraient d'être inexacts .

Nous proposons une lecture au quatrième jour, avec une quotation de une à quatre croix, avec la correspondance suivante, donnée comme ordre de grandeur .

+	jusqu'à 30% de cellules blastiques.
++	de 30 à 60% .
+++	de 60 à 90% .
++++	au-delà de 90% .

(ces pourcentages s'établissant par rapport au nombre de cellules rencontrées) .

EXEMPLES D'APPLICATION DE CETTE TECHNIQUE

ETUDE DU PHENOMENE DE TRANSFORMATION AU COURS DE QUELQUES ETATS PATHOLOGIQUES

Nous avons eu l'occasion d'utiliser cette technique pour étudier le phénomène de transformation au cours des états pathologiques suivants :

Un cas de mononucléose infectieuse .

sans PHA 0
avec PHA +++

Un cas de maladie de Hodgkin (à cuti positive).

avec PHA +++

Trois cas de maladie de Waldenström.

. dans les trois cas : sans PHA 0
avec PHA +++

Un cas de trypanosomiase Africaine

sans PHA 0
avec PHA +++

Un cas de paludisme à Plasmodium Falciparum (28).

. au début du traitement . sans PHA 0
avec PHA +++

Un cas de lymphoréticulosarcome (localisation ganglionnaire) .

avec PHA +++

présence exclusive de cellules blastiques sans tendance à l'évolution réticulaire .

Un cas de leucose lymphoïde chronique (9-20-35) .

avec PHA 0 au 4ème jour
0 au 8ème jour
après transfert en milieu neuf le 4ème jour .

Un cas de lymphosarcome avec invasion médullaire.

sans PHA 0
avec PHA +++

C'est dans ce dernier cas seulement que la culture nous a apporté un élément intéressant pour le diagnostic .

ETUDE DE DIFFERENTS FACTEURS DE CULTURE

La mise au point de notre technique nous a conduit à étudier certains facteurs ayant une incidence sur le phénomène de transformation :

- Le calibre et les dimensions des tubes utilisés ont fait l'objet de différentes études (18). Pour notre part nous remarquons que le phénomène est en partie freiné quand on utilise des pipettes de longueur trop importante, leur diamètre restant égal à 0,5cm. Par ailleurs nous obtenons d'excellents résultats avec des micropipettes de 3 mm de diamètre et 3cm de hauteur.

- Différents essais d'agitation et d'inclinaison des pipettes ne nous ont pas apporté d'amélioration notable : la position verticale et l'absence d'agitation ont été définitivement adoptées pour des raisons de commodité.

- Nous avons vérifié que le phénomène de transformation se produit en aérobiose comme en anaérobiose absolue (10). Nous maintenons cependant une poche à air constante d'un tiers du volume total de la pipette.

- Les cultures effectuées à 41° n'ont présenté de transformation qu'en présence de PHA.

- Il nous paraît intéressant d'utiliser cette technique pour l'étude d'autres facteurs susceptibles d'avoir une action sur le phénomène de transformation, en particulier l'effet des radiations (41) et de certains médicaments (corticoïdes - nivaquine) (10).

Un autre point intéressant est le devenir de ces cellules blastiques . Leur stimulation par différents extraits d'organes hématopoïétiques nous a paru digne d'étude .

Jusqu'à ce jour, nous n'avons pu réaliser que deux fois le protocole suivant :

Au quatrième jour de culture selon la méthode décrite, nous transférons les cellules blastiques obtenues en présence de PHA , dans du plasma et du milieu d'une part, dans du plasma et milieu avec extrait médullaire hématopoïétique d'autre part, toutes conditions de culture étant par ailleurs égales .

Dans le premier cas nous obtenons, le quatrième jour après le transfert, de nombreuses cellules de type blastique, dont le cytoplasme est peu vacuolaire , et présentant de nombreuses mitoses ; alors que ce nouveau milieu ne contient plus de PHA .

Dans le second cas, toujours le quatrième jour après le transfert, l'aspect est le suivant : nombreuses cellules lymphoplasmocytoïdes isolées ou en placards . On ne retrouve plus aucune cellule de type blastique .

Ces résultats que nous mentionnons , sans les interpréter car il convient avant tout de vérifier leur reproductibilité, nous paraissent encourageants pour continuer d'appliquer cette technique des transferts à l'étude "in vitro" du devenir de la cellule transformée en présence de phytohémagglutinine.

CONCLUSIONS

La technique de culture proposée est spécialement adaptée à l'étude théorique du phénomène de transformation lymphocytaire en présence de phytohémagglutinine . En éliminant le maximum de paramètres cette technique permet, à partir d'un prélèvement minime, d'étudier le phénomène en faisant varier les conditions physico-chimiques de la culture, et de préciser les différents aspects morphologiques de la cellule transformée, tant chez le sujet normal qu'au cours de certains états pathologiques.

SERMENT

En présence des maîtres de cette École, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je donnerai mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Reconnaissant envers mes Maîtres, je tiendrai leurs enfants et ceux de mes confrères pour des frères, et s'ils devaient apprendre la médecine ou recourir à mes soins je les instruirai et les soignerai sans salaire ni engagement.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir heureusement de la vie et de ma profession, honoré à jamais parmi les hommes. Si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

Vu,
Le Doyen :
H. BRICAUD

Bon à imprimer,
Le Président de Thèse :
G. MORETTI

Vu et permis d'imprimer,
Bordeaux, le 1er juillet 1969
Le Recteur de l'Université :
J. BABIN

BIBLIOGRAPHIE

1- BERMAN L. M. D. et STULBERG C. S. - Primary cultures of macrophages from normal human peripheral blood .
Lab. invest. 1962, 11, 1322 .

2- BERNARD C. , GERALDES A. et BOIRON M. - Action de la Phytohemagglutinine in vitro sur les lymphocytes des L. L. C.
Nlle Rev. Franç. d'Hématologie . 1964, 4 , n°1, 69-76 .

3- BESSIS M. - Traité de cytologie sanguine .
Masson et Cie Editeurs, Paris 1954 .

4- BIOZZI G. et coll. - La cinétique des cellules productrices d'anticorps étudiées par la méthode des rosettes .
Leçon faite le 16-II-1967 à l'Hôpital Paul Brousse .
C. R. Presse Médicale 1967, 75, 29, 1521 .

5- BOURDILLON J. - A cristalline bean, seed protein in combination with phytic acid .
J. Biol. Chem. 1951, 189, 65-72 .

6- BOURDILLON J. - Cristalline protein from commercial beans (Phaseaolus vulgaris) .
J. Biol. Chem. 1949, 180, 553-556 .

7- BRANDT I. , BORJESON T. , NORDEN A. et OLSSON I. Separation of lymphocytes from peripheral blood by means of a glass column . A method for the in vitro culture of lymphocyte .
Acta Med. Scand. 1962, 172-459 .

8- CARSTAIRS K. - The samll lymphocyte, its possible pluripotential quality .
Lancet 1962, n°7234, 829-832 .

9- CATHALA F. - L'effet de la Phytohémagglutinine sur les lymphocytes au cours des différentes leucémies .
Presse Méd. 1966, 74-, n°38, 1984 .

10- COOPER E.H . et AMIEL J. L. - La prolifération des lymphocytes humains "in vitro" .
Rev. Fr. Et. Clin. Biol. 1965, 10, n°5, 469-487 .

11- COOPER E.H . , BARKHAN P. et HALE A. J. - Observations on the proliferation of human leucocytes cultured with PHA .
Brit. J. Haematol. 1963, 9 , 101 .

12- COULET M. , CLUZEL R. , BEZOU M. J. - Procédé de purification de l'hémagglutinine de Phaseolus vulgaris .
Lyon Pharm. n° spécial 1956-119-122 .

13- COULSON A. S. et CHALMERS D. G. - Separation of viable lymphocyte from human blood.
Lancet 1964, n°7331, 468-469 .

14- CRONKITE E. P. - Histoire de nos connaissances sur la fonction des lymphocytes .
Nlle Revue Française d'Hématologie .
1968, 8, n°5, 495-502 .

15- DECAUX F. et BOURSIER B. - Les propriétés mitogénétiques de l'extrait de haricot vulgaire (Phaseolus vulgaris) . Ses applications dans la prévention et le traitement des leucopénies médicamenteuses .
G. M. de France , 1968, 75, n°29, 5875-5888 .

16- DREYFUS B. - Phytohemagglutinine et multiplication cellulaire .
Nouv. Rev. Fr. d'Hématologie, 1965, 5 , 393-396.

17- DUBREUIL G. et BAUDRIMONT A. - Manuel théorique et pratique d'histologie .
Vigot frères Editeurs Paris 1932 .

18- DUCOS J. , COLOMBIES P. et SALLES-MOURLAK A. M. - Influence du volume total du milieu de culture et de sa concentration en protéines humaines sur la transformation blastique des lymphocytes .
Société de Biologie de Toulouse, C. R. du 31 Mai 1967 .

19- ELVES M. W. , GOUGH J. , CHAPMAN J. A. et ISRAELS M. C. G. - Electron microscopy studies of lymphocytes transformation under influence of phytohemagglutinine .
Lancet 1964, 1, 306-308 .

20- ELVES M. W. et WILKINSON J. F. - The effects of phytohemagglutinine on normal and leukaemic leucocytes when cultured in vitro .
Expert. Cell. Res. 1963, 30, 200 .

21- FAVIER Y. , VIETTE M. , SAINT-PAUL M. et DUPLAN J. F. - Methode simplifiée de culture de leucocytes à partir de sang humain (Influence de la phaséoline) .
Nouv. Rev. Franç. d'Hématologie 1961, 1 , 872 .

22- FIRKET H. - L'évolution de l'ultrastructure du lymphocyte humain en culture sous l'influence de la phytohémagglutinine . Comparaison avec le lymphocyte en culture mixte .
Nouv. Rev. Franç. d'Hématologie .
1969, 9 , n°2, 159-176 .

23- HALPERN B. , KY N. T. , AMACHE N. , LAGRUE G. et HAZARD I. - Diagnostic de l'allergie médicamenteuse in vitro par l'utilisation du test de transformation lymphoblastique (T. T. L.) .
Presse Med. 1967, 75 , n°10, 461-465 .

24- HALPERN B. , ROBINEAUX R. , KOURILSKY R. , LEPINAY A. , LIACOPOULOS-BRIOT M. - Etude morphodynamique et ultrastructurale de la stimulation lymphocytaire par la phytohemagglutinine .
Bull. Soc. Chim. Biol. 1968, 50, n°5-6, 1059-1076.

25- HARKMAN P. et BALLAS A. - Phytohemagglutinine-Separation of the haemagglutinating and mitogenetic principe .
Nature , 1963, 200-141 .

26- HASHEM N. et KABARITY A. - Mitogenetic activity of legumes and other vegetables seed on peripheral lymphocytes cultures .
Lancet 1966, n°7452, 1428-1429 .

27- HIRSCHHORN K. - Discussion of lymphocyte transformation .
Fed. Proc. 1968, 27, 1 .

28- HIRSCHHORN K. et HURVITZ D. - The suppression of in vitro lymphocyte reponse by chloroquine.
N. England J. Med. 1965, 1, 273, 23-26 .

29- HIRSCHHORN K., KOLODNY R. L. , HASHEM N. et BACH F. - Mitogenetic action of phytohemagglutinine
Lancet 1963, 2, 305 .

30- JOHNSON G. J. et RUSSELL P. S. - Reaction of human lymphocytes in culture to components of the médium .
Nature 1965, n°5008, 343-345 .

31- KY N. T. , HALPERN B. N. , LAGRUE G. -LANGLOIS C, La transformation lymphoblastique in vitro des lymphocytes sanguins appliquée à l'étude de l'allergie microbienne .
La Presse Méd. 1966, 74, n°22, 1119-1122 .

32- MAC KINNEY A. A. , STOHLMAN F. et BRECHER G. The kinetics of cell proliferation in cultures of human peripheral blood .
Blood 1962, 19, 349 .

33- MARSHALL W. H. et ROBERTS K. B. - Cultures of human blood lymphocytes in the presence of a phytohemagglutinin .
J. Physiol. 1963, 44, 166 .

34- MORGAN J. F., HORTON H. J., PARKER R. C. - Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1950, 73, 1 .

35- NOWELL P. C. - Differentiation of human leukemic leucocytes in tissue culture . Exp. Cell. Res. 1960, 19, 267 .

36- NOWELL P. C. - Phytohemagglutinin : an initiator of mitosis in cultures of normal human leucocytes . Cancer Res. 1960, 20 , 462-466 .

37- OSBORNE T. B., MENDEL L. B., HARRIS I. F. - The study of the protein of the castor bean with special reference to the isolation of ricin. A. M. J., Physiol. 1905, 14, 259-286 .

38- PINON C. - L'allergie médicamenteuse et son diagnostic par le test de transformation lymphoblastique. Thèse Paris, 1968 .

39- RABINOWITZ Y. - Separation of lymphocyte, polymorphonuclear leucocytes and monocytes on glass column induding tissue culture observations . Blood 1964, 23, 811-828 .

40- REVILLARD J. P., BROCHIER J. - La circulation des lymphocytes , son rôle dans les réactions immunologiques . Cahiers médicaux lyonnais . 1967, 43 , n°15 , 1377-1394 .

41- SCHREK R. - In vitro longevity and radiosensitivity of lymphocytes of man and other species . Am. J. Clin. Path. 1961, 31, 112 .

42- TANAKA Y., EPSTEIN L. B., BRECHER G. et STOHLMAN F. - Transformation of lymphocytes in cultures of human peripheral blood . Blood 1963, 22, 614 .

43- THIERY J. P. - Ultrastructure et fonctions des cellules impliquées dans la réaction immunitaire . Bul. Soc. Chim. Biol. 1968, 50, n°5-6 , 1077-1099 .

14- WOOD T. A. et FRENKEL E. P. - The atypical lymphocyte .
Am. J. Med. 1967, 42, 923 .

EDITIONS BERGERET -2,rue Bergeret - BORDEAUX. Tél.91.12.59